

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

25.05.00 #2

REC'D 27 JUL 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

JP00/03372

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 5月25日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第145342号

出 願 人

Applicant (s):

工業技術院長

E 54

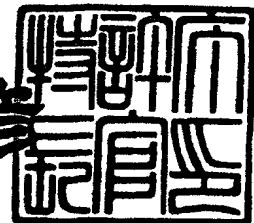
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3053985

特平 11-145342

【書類名】 特許願

【整理番号】 11900266

【提出日】 平成11年 5月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N  
C12Q

【発明の名称】 新規低温細菌を検出するためのDNAプローブ

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学  
工業技術研究所内

【氏名】 丸山 明彦

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学  
工業技術研究所内

【氏名】 北村 恵子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学  
工業技術研究所内

【氏名】 倉根 隆一郎

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院 生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規低温細菌を検出するためのDNAプローブ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の塩基配列を有する16S rDNA。

【請求項2】 配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項3】 配列番号1の塩基配列の一部が配列番号2の塩基配列である請求項2記載のプローブ。

【請求項4】 Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定するための請求項2または3記載のプローブ。

【請求項5】 配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定する方法。

【請求項6】 好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非孢子形成性、およびオキシダーゼ陽性であることを特徴とするPsychrobacter pacificus。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、深海微生物を指標とした深海水の循環やその湧昇のモニタリングの技術に関し、より詳細には、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を種特異的に検出する技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

日本近海の深海水は、グリーンランド沖で沈み込んだ密度の高い海水に端を発し、さらに南極海周辺での高密度海水の加入を経て日本海溝をはじめとする北太平洋海域へ流れ込む海洋大循環流により供給されていると推測されている。このような深海水は豊富な栄養塩類を含んでおり、湧昇海域では高い生物生産活動が

見られるため、これを利用した深海水の利用が現在検討されている。

【0003】

また、これまで利用されていなかった深海魚が、食料、餌料として用いられはじめている。

さらに、地球規模や地域規模での環境汚染問題に関連し、人間活動の結果放出または廃棄される二酸化炭素や放射性廃棄物、産業廃棄物等を日本近海の深海域に投棄することが検討されている。

【0004】

しかし、これら深海水や深海域に関する知見が不足しているため、深海水が表層の生物活動に及ぼす影響の評価や二酸化炭素や放射性廃棄物、産業廃棄物等の深海投棄が深海の生物活動に及ぼす影響の評価が困難な状況にある。また、グローバルな深層海水の循環を知る上で有用な指標生物の報告もない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、深海水や深海域を人為的に利用するにあたって生物学的な安全性評価を行う技術、具体的には、深海に固有に生息する微生物種の遺伝情報の特徴に基づき、該微生物およびその近縁種を種特異的に検出する技術の提供を目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、日本海溝深海水由来の新規低温細菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列情報に基づき、本微生物を分子・細胞レベルにおいて特異的に検出することを可能にするオリゴヌクレオチドプローブを開発して、本発明を完成させるに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、配列番号1の塩基配列を有する16S rDNAを提供する。

また、本発明は、配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを提供する。オリゴヌクレオチドプローブはRNAプローブまたはDNAプローブのいずれであってもよい。配列番号1の塩基配列の一部としては配列番号2の塩

基配列を挙げることができる。上記のプローブは、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定するために使用することができる。

【0008】

さらに、本発明は、配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定する方法を提供する。

また、本発明は、好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非孢子形成性、およびオキシダーゼ陽性であることを特徴とするPsychrobacter pacificusも提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の新種の微生物、Psychrobacter pacificusは、八丈島沖の日本海溝水深 6,000mの海水より、1気圧摂氏4度の低温培養条件下で優占的に出現した従属栄養性微生物である。Psychrobacter pacificusとしては、NIBH P2J2、NIBH P2J3、NIBH P2J13、NIBH P2K6、NIBH P2K17およびNIBH P2K18の6種の株が本発明者らにより単離されている。これらのうち、NIBH P2J3、NIBH P2K6およびNIBH P2K18の分類学的性質を以下の表1、2および3にまとめる。なお、表1、2および3には、同時に単離された他の菌株や本菌の近縁種についても分類学的性質が記載されている。

【0010】

【表1】

表1 日本海溝表層海水および深海水由来の低温細菌の運動性および細胞外器官

Strain	Motility test <sup>1</sup> (microscopic)	Motility test <sup>2</sup> (agar plate)	Extracellular organ <sup>3</sup>	Phylogenetic location
Surface seawater				
P1H8	-	-	Flagella*	<i>Halomonadaceae</i>
P1H13	-	-	None	<i>Halomonadaceae</i>
P1H14	-	-	None	<i>Halomonadaceae</i>
P1H22	+	+	Flagella	<i>Halomonadaceae</i>
P1H25	+	+	Flagella	<i>Halomonadaceae</i>
Deep seawater				
P2J2	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
P2J3	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
P2J13	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
P2K6	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
P2K17	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
P2K18	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>

【0011】

1 : ノマルスキー光学系を用いた光学顕微鏡下。2 : 栄養素勾配を有する半固形寒天培地上。3 : 電子顕微鏡観察による。- : 陰性。Flagella\* : 鞭毛付着が時折観察された。w : 弱い、ぴくつとした動き。

[0012]

[表2]

表2 サイクロバクター・パシフィクスおよび近縁種の表現型の特徴とGC含量

Characteristics <sup>a</sup>	<i>Psychrobacter pacificus</i>			Summary	<i>Psychrobacter immobilis</i> <sup>a</sup> (Phenon 1)		<i>Psychrobacter urethlovorus</i> <sup>a</sup> (Phenon 2)		<i>Psychrobacter frigidiicola</i> <sup>a</sup> (Phenon 3)		<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i> ACAM 539 <sup>b</sup>		<i>Psychrobacter glaciicola</i> ACAM 483 <sup>c</sup>	
	NIBH strain no.													
	P2J3	P2K6	P2K18		P2J3 P2K6 P2K18		P2J3 P2K6 P2K18		P2J3 P2K6 P2K18		P2J3 P2K6 P2K18		P2J3 P2K6 P2K18	
Urease activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine deaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tryptophan deaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in NaCl (%):														
0	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at (°C):														
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid production from:														
Glucose	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
"Others"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNPG test <sup>d</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Use as sole carbon and energy sources:														
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-hydroxy-benzoate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-hydroxy-butyrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucamate <sup>e</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-histidine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-malate <sup>f</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-serine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Substrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
n-valerate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
"Others"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNA G+C content (mol %)	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44

[0013]

a) 全ての種および菌株は、オキシダーゼ、カタラーゼ、4~15°Cにおける増殖、6.5% NaClに対する耐性、ならびに唯一の炭素およびエネルギー源としてのL-プロリンの利用について陽性であった。 b) Rowman et al. (1996) Int. J. Sy.



st. Bacteriol. 46:841-848のデータ。c) Bowman et al., (1997) System. Appl. Microbiol. 20:209-215のデータ。d) API 20 NEテストによって決定した。化合物の利用性はAPI ID 32 GNテストを用いて推定した。PNPGテスト: パラ-ニトロフェニル- ( $\beta$ ) -D-ガラクトピラノシドを用いた $\beta$ -ガラクトシダーゼについてのテスト。

【0014】

\*その他: グルコース発酵、インドール産生、エスクリンの加水分解、ゼラチンの加水分解、およびアルギニンジヒドロラーゼ。(d)

\*\*その他: N-アセチル-D-グルコサミン、m-ヒドロキシ-ベンゾエート、グリコーゲン、酢酸フェニル。以下の炭素およびエネルギー源は、いずれの種または菌株によっても利用されなかった: N-アセチルグルコサミン、アジピン酸、L-アラビノース、カプリン酸、L-フコース、2-ケト-グルコネート、5-ケト-グルコネート、(D)グルコース、(ミオ)イノシトール、イタコン酸、マルトース、D-マンニトール、D-メリピオース、(L)ラムノース、D-リボース、(D)サリシン、D-ソルビトール、スクロース。なお( ) はBowmanら(1996)が用いた基質の型を示す。表中の利用の記載において、( ) は光学異性体の型を示す。表中のサイクロバクター・パシフィクス の欄における陽性菌株の頻度: +, 100%; +v, 67%; -v, 33%; -, 0%。他のサイクロバクター種の欄における陽性菌株の頻度: +, 100-90%; v+, 89-11%; v-, 10-0%。w: 弱い反応。

NIBH P2K6菌株は、サイクロバクター・パシフィクスの基準株であると規定された。

【0015】

【表3】

表3 サイクロバクター・パシフィクスの脂肪酸組成および主要キノン型

Composition	<i>Psychrobacter pacificus</i>			Average content	<i>Psychrobacter immobilis</i> ATCC 43116
	NIBH strain no.				
	P2J3	P2K6*	P2K18		
Fatty acid:					
10:0	1.3	Tr	1.2	0.8 (0.7)	0.9
11:0	0.1	Tr	0.2	0.1 (0.1)	Tr
12:0	2.2	0.8	2.3	1.8 (0.8)	Tr
14:0	0.7	0.6	0.5	0.6 (0.1)	0.3
14:1 (X1)	0.1	0.2	Tr	0.1 (0.1)	0.1
15:0	0.4	Tr	0.4	0.3 (0.2)	0.2
16:0	7.3	8.7	6.5	7.5 (1.1)	4.3
16:1 (w7c)	9.7	15.8	6.6	10.7 (4.7)	3.8
16:1 (X2)	0.4	0.4	0.3	0.4 (0.1)	0.4
17:0	2.7	5.6	4.8	4.4 (1.5)	4.2
i17:0	0.6	Tr	0.4	0.3 (0.3)	Tr
17:1 (X3)	5.1	1.5	5.1	3.9 (2.1)	6.8
18:0	9.4	5.6	13.1	9.4 (3.8)	8.0
18:1 (w7c)	1.2	0.8	0.7	0.9 (0.3)	0.8
18:1 (w9c)	50.1	52.8	50.9	51.3 (1.4)	63.1
18:2	3.4	2.4	1.8	2.5 (0.8)	3.5
19:0	0.4	0.4	0.6	0.5 (0.1)	0.9
20:0	Tr	Tr	Tr	Tr	0.1
Total	95.1	95.6	95.4	95.5	97.4
Total unsaturated	70.0	73.9	65.4	69.8	75.0
Hydroxy fatty acid:					
3-OH 12:0	4.1	3.6	3.9	3.9 (0.3)	2.2
3-OH 14:0	0.8	0.8	0.7	0.8 (0.1)	0.4
Total	4.9	4.4	4.6	4.6 (0.3)	2.6
Major quinone type	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8

【0016】

X1-3: 正確な二重結合の位置は決定されていない。Tr: ごく微量(<0.1%)。

カッコ内の数字は標準偏差を示す(n=3)。\*: 基準株。

*Psychrobacter pacificus*は、好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非孢子形成性、オキシダーゼ陽性の長さ1.0-1.5  $\mu$ m、幅約1  $\mu$ mの球桿菌である。これらの菌株は細胞外器官として多数のフィムブリエ（繊毛）を生ずるが、鞭毛は生

じない。ポリペプトンおよび酵母抽出物を含む寒天プレート上に、縁が欠けていない円形で凸状の、色がオフホワイトのコロニーを形成する。蛍光色素は全く形成されない。至適増殖には海水または約3%のNaClを必要とするが、殆どの菌株はNaCl濃度が0または8%以上の場合は増殖しない。4℃では定常期に達するのに1~2週間を要するが、これらの菌株は4℃で20℃における増殖収率(growth yield)に匹敵する増殖収率を示す。約25℃で至適増殖が起こり、限界増殖温度は38℃である。グルコース、キシロースおよびアラビノースから酸が好氣的に形成される。これらの菌株はウレアーゼ活性が陽性であるが、フェニルアラニンデアミナーゼおよびトリプトファンデアミナーゼについては陰性である。この種はグルコース発酵、インドール産生、エスクリン加水分解、ゼラチン加水分解およびアルギニンジヒドロラーゼという生化学試験について陰性である。この種は唯一の炭素およびエネルギー源としてL-ヒスチジンおよびDL-リンゴ酸を利用する。いくつかの菌株は酢酸、L-アラニン、3-ヒドロキシ-ブチレート、乳酸、マロン酸およびスベリン酸を利用するが、p-ヒドロキシ-ベンゾエート、クエン酸、グルコン酸、プロピオン酸、L-セリンまたはn-吉草酸を利用する菌株はない。18:1 n9cが主要な脂肪酸であり、またQ 8が主要なキノンである。DNA G+C含有量は、HPLCで測定すると43~44モル%である。基準株は、日本国八丈島沖日本海溝の深度6,000 mの海水から4℃で単離したNIBH P2K6である。この菌株は、財団法人醗酵研究所に寄託されている(IFO 16270)。また、*Psychrobacter pacificus* NIBH P2K6 (IFO 16270) は工業技術院生命工学工業技術研究所に平成11年5月21日付けで寄託された(受託番号: FERM P-17393)。

#### 【0017】

*Psychrobacter pacificus*は新種であり、その近縁種は南極域で多数分離されている(Bowman et al., (1996) Int. J. Syst. Bacteriol. 46:841-848, Bowman et al., (1997) System. Appl. Microbiol. 20:209-215) ことから、グローバルな深層海水の循環に関連した指標生物として有用であることがわかる。グローバルな深層海水の循環については、太平洋海域では定常的に南極から日本海溝に向け深層海水が流れていることが知られている(Stommel, H. (1958) Deep-Sea Res. 5:80-82)。

【0018】

配列番号1の塩基配列を有する16S rDNAは、Psychrobacter pacificus NIBH P2K6から得られる。すなわち、Psychrobacter pacificus NIBH P2K6の菌体から標準的な方法によりゲノムDNAを抽出し、適切なプライマーを用いて16S rDNAをPCRにより増幅する(Lane, D.L. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, pp.115-175. Edited by E. Stackebrandt, M. Goodfellow. West Sussex: John Wiley & Sons)。PCR産物から過剰なプライマーおよびdNTPを除去した後、適切なプライマーを用いるサイクルシーケンス法により、精製PCR産物の配列を直接決定することができる。その配列を配列番号1に示す。

【0019】

Psychrobacter pacificus NIBH P2K6の16S rRNA遺伝子の塩基配列情報に基づき、本菌に特異的な塩基配列領域を抽出し、分子・細胞レベルでの検出を可能にするDNAプローブを作製する。本菌に特異的な塩基配列領域としては、配列番号1の塩基配列の塩基番号458～476の領域(大腸菌の配列に準じた場合は、塩基番号469～487の領域)などを挙げる事ができる。この領域に対応する塩基長10～50bp、好ましくは塩基長15～25bpのプローブを作製するとよい。好ましい一例として、以下の塩基配列を有するプローブを挙げる事ができる。

・5'TAATGTCATCGTCCCCGGG3' (配列番号2)

【0020】

プローブは、ホスホルアミド法(Beacage and Carruthers, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862 (1981))またはトリエステル法(Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981))により合成することができる。あるいは、自動合成装置を使用してプローブを合成してもよい。

さらに、プローブは、アイソトープ、蛍光色素、DIG (ジゴキシゲニン) などで標識するとよい。標識としては、Cy5 (インドジカルボシアニン) やTRITC (テトラメチルローダミンイソチオシアネート)、FITC (フルオレセインイソチオシアネート) 等の蛍光色素やDIG (ジゴキシゲニン) 等のハプテンを挙げる事ができる。

【0021】

本発明のプロープを用いて、種々のハイブリダイゼーション法（サザンブロット法、ノーザンブロット法、コロニーハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーション（例えば、FISH）など）により、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種を検出または同定することができる。Psychrobacter pacificusおよびPsychrobacter glacincolaの近縁種としては、データベース上に記載されているが同定根拠が不明なPsychrobacter glacincola (AF025555、PGU85879、PGU85878、PGU85877、PGU85876)、Psychrobacter immobilis (PIU85880)、Psychrobacter sp. (PSU85874) 等の菌株を挙げることができる。

【0022】

配列番号2の塩基配列のプロープを用いて、Psychrobacter pacificusを検出または同定する方法の一例について、以下に説明する。

パラフォルムアルデヒド等を用いて固定した微生物試料を、ゼラチン等有機被膜を形成させたスライドガラス上に塗抹し、微生物細胞をスライドガラスの有機被膜上に不動化する。エタノールで脱水、または微生物細胞を室温で一晩程乾燥させた後、微生物のゲノムDNAおよびRNAと該DNAプロープとの間でハイブリダイゼーションを行い、洗浄処理により遊離または不完全結合DNAプロープを除去する。通常の蛍光顕微鏡観察手法に準じて微生物細胞を観察し、対象とする微生物細胞に相補結合した蛍光標識DNAプロープの蛍光を検出する。コントロールとして、非特異的なDNAプロープや対象とする微生物属種外の微生物を用い、上記実験を行う。対象とした微生物がDNAプロープで標的とした微生物であった場合は、細胞内核酸と該DNAプロープとの相補結合により細胞全体が蛍光を発するので検出、同定ができる。

本発明のプロープは、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種の種特異的な検出を可能にするばかりでなく、検出の迅速化と精度向上をもたらす点でも非常に有益である。

【0023】

【実施例】

本発明を以下の実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】 Psychrobacter pacificus 菌株の単離と16S rRNA遺伝子の配列決定

日本海溝の表層および深海環境から単離した67菌株より全部で16菌株を選択した。このうち、11菌株をモラキセラ菌に類似した細菌であると仮に同定した。異なる寒天培地、例えばポリペプトンおよび酵母抽出物を含有する人工海水に基づく1/2 TZ (Maruyama, A et al., (1993) J. Oceanogr. 49, 353-367)、Marine Agar (Difco; Detroit, MI, USA) およびNitrient Agar (Difco) 等を用いてこれらの菌株を純化した。各菌株を20℃でインキュベートして集菌し、ゲノムDNAを得た。0.3%の寒天を含む1/2 TZ半固形寒天培地を4℃での保存のために用いた。ガラス試験管に封入した乾燥菌体もまた長期保存のために4℃で保存した。

【0024】

深海水から単離したモラキセラ菌に類似した菌株について、下記の直接配列決定によって16S rRNA遺伝子を決定した。すなわち、菌体を遠心により集菌し、洗浄し、そしてTE緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) に再懸濁した。セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB)、フェノール、およびクロロフォルム/イソアミルアルコール (Murray, M.G. et al., (1980) Nucleic Acids Res 8, 4321-4325) を用いて標準的方法によってゲノムDNAを抽出した。ほぼ完全な16S rRNA遺伝子を得るため、プライマー-27f および1525r (Lane, D.L. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, pp.115-175. Edited by E. Stackebrandt, M. Goodfellow. West Sussex: John Wiley & Sons) ならびに文献 (Maruyama, A. et al., (1997) Mar. Biol 128, 705-711) に記載のPCRサイクルを用いて、Gene Amp PCR 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., USA) によってPCRを実施した。SUPREC-02 (宝酒造) を用いてPCR産物から過剰なプライマーおよびdNTPを除去した。自動DNAシーケンサー (ALFred; Pharmacia LKB, Sweden) を用いて、適切なフォワードお

よびリバースプライマー(Lane, D.L. (1991)、上記)を用いて、製造者の指示に従って、サイクルシーケンス法により精製PCR産物を直接配列決定した。具体的には、上記プライマーは大腸菌番号系における342r、359f (5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG TG (配列番号3) ; 20量体)、519r、803r (5'-CAT CGT TTA CGG CGT GGA C (配列番号4) ; 19量体)、821f (5'-GTC CAC GCC GTA AAC GAT G (配列番号5) ; 19量体)、1104r (5'-TTG CGC TCG TTG CGG GAC (配列番号6) ; 18量体)、および1111f (5'-GTC CCG CAA CGA GCG CAA (配列番号7) ; 18量体)である。各16S rDNA領域断片の配列を両方の鎖について決定し、GENETYX ソフトウェア(バージョン8 ; ソフトウェア開発株式会社)を用いて連結した。モラキセラ菌に類似した深海の菌株を除いて、標準種モラキセラ・ラクナータ菌(*Moraxella lacunata*) ATCC 17967を含む他の細菌の16S rDNAを以前に記述された(Maruyama, A. et al., (1997)上記)ように抽出し、増幅し、サブクローン化した。CLUSTAL W (バージョン1.71; 44) 中の多重アラインメントプログラムを用いて配列を並べた。CLUSTAL W プロファイルアラインメントオプションを用いて、我々が決定した配列をアントワープ大学(University of Antwerp)のrRNA www サーバー([http://rrna,uia,ac,be/](http://rrna.uia.ac.be/);45)から得た公知の並置させた配列に合わせた。この並置したデータマトリックスから、空隙(gap)があるすべての位置、すなわち未決定および曖昧な配列を除去した。*Psychrobacter pacificus* NIBH P2K 6の16S rRNA遺伝子の配列を配列番号1に示す。

【0025】

【実施例2】 作製プローブのデータベース検索結果

配列中2つまでのミスマッチを許す条件で、配列番号2の塩基配列をプローブ配列(「Psypac469-487」と命名する。)としてRDP-DB(データベース)を検索したところ、Psypac469-487と一致するものは、*Psychrobacter glacincola* (Pinhassら)(ミスマッチ0)、*Psychrobacter* sp., *P. immobilis*および4種の*P. glacincola*関連株(Bowmannら, Appl. Environ. Microbiol. 63, 3068-3078, 1997)(ミスマッチ1)、*Psychrobacter* sp., *Psychrobacter* sp. Ant9および*Moraxella* sp. Ant7 (Pinhassら)(ミスマッチ2)であった。このことは、Psypac469-487が*Psychrobacter pacificus*の他に、*Psychrobacter glacincola*類縁菌

株およびこれらの近縁種を特異的に検出可能であることを示している。

【0026】

以上の結果は、作製プローブの塩基配列が、既存菌株を網羅する DNA データベース上で Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincola およびこれらの近縁種に相補性を示すのみで、本プローブが本二種の種特異的検出に極めて有効であることを示す。

【0027】

【実施例 3】 作製プローブのハイブリダイゼーション試験結果

(1) 微生物試料の調整

用いた微生物試料の属種株名は、表 4 に示した。この中で、Psychrobacter pacificus 菌株は、八丈島沖日本海溝の 6000 m 深海水試料より 4℃ で培養可能な微生物として分離されたもので、表層海水中には全く見出されなかった (Maruyama et al. Marine Biology 128, 705-711, 1997)。Bacillus marinus は Marine Broth (Difco) を用いて好気条件下 20℃ で、Psychrobacter phenylpyruvicus は ATCC Culture Medium 4 番を用いて好気条件下 30℃ で、培養した。これ以外の細菌は、1/2TZ 液体培地 (Maruyama et al., J. Oceanogr. 49, 353-367, 1993) を用いて好気条件下 10~20℃ で培養した。

【0028】

培養された微生物は、最終濃度 3% のパラフォルムアルデヒドを用いて 4℃ で一晩固定された。パラフォルムアルデヒドは、3 x PBS (Phosphate Buffer Saline: NaCl: 24 g、KCl: 0.6 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0.72 g、pH 7.4) 中に 15% となるように予め溶解しておき、試料: パラフォルムアルデヒド = 4:1 で混合して使用した。

【0029】

(2) 試料の DNA プローブによる染色

この固定した微生物細胞を、あらかじめゼラチンを塗布した直径 11 mm の穴の開いたテフロンコートスライド上に吸着させ、エタノール脱水、または室温で一晩乾燥させた。その後、試料穴中にハイブリダイゼーション溶液 (NaCl: 0.9 M、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0): 50 mM、EDTA: 5 mM



, SDS: 0.5%, Denhardt solution: final  $\times 10$ , Poly (A): 1.0 mg/ml) を  $50 \mu\text{l}$  添加した。上記のように調整したスライドガラスを、乾燥を防ぐために少量の 3xPBS を加えた  $50 \text{ ml}$  コニカルチューブ内に静置し、 $42^\circ\text{C}$  前後でプレハイブリダイゼーションを 30 分間行った。

#### 【0030】

5' 末を Cy5, TRITC (テトラメチルローダミンイソチオシアネート) または FITC (フルオレセインイソチオシアネート) でラベル化した蛍光標識オリゴヌクレオチド DNA プローブを作成し、上記ハイブリダイゼーション溶液にそれぞれのプローブを  $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$  となるように添加した。各々のオリゴヌクレオチド DNA プローブの最適温度で 4 時間半ハイブリダイゼーションを行った。未反応のオリゴヌクレオチドプローブ DNA を除去するために、各々のオリゴヌクレオチド DNA プローブの適温で洗浄溶液 (NaCl: 0.9M, リン酸ナトリウム: 0.5 mM, SDS: 0.1%, pH=7.0) 中にスライドガラスを入れ、30 分間洗浄した。

#### 【0031】

用いたオリゴヌクレオチド DNA プローブとしては、該 Psypac469-487 の他、ドメイン Bacteria (旧称 Eubacteria) の共通プローブである Eub338-355 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT (配列番号 8)) やコントロール用の Cont (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG (配列番号 9)) を用いた。

#### 【0032】

##### (3) 試料の DNA 染色

ハイブリダイゼーション終了後、スライドガラスに終濃度  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の DAPI 溶液を加え、室温で 10 分間反応させ、微生物細胞内に存在する DNA の染色を行った。反応終了後、純水中にスライドガラスを浸し、15 分間洗浄した後、室温で乾燥した。

#### 【0033】

##### (4) 試料の蛍光顕微鏡観察

乾燥させたスライドガラスの微生物試料上に DABCO (ジアソビスクロオプ

タン) 溶液 (1 g/100 ml (10 ml PBS+90 ml Glycerol)) 等の退色防止剤を加え、カバーガラスを載せ、油浸条件下で蛍光顕微鏡による観察を行った。必要に応じ、蛍光顕微鏡に取り付けた冷却CCDカメラで各々の色素に対する蛍光画像を取得し、画像を解析した。結果を表4に示す。

【0034】

【表4】

表4 FISH法による蛍光顕微鏡下でのプローブ有効性試験の結果

使用菌株	蛍光標識 DNAプローブ			DAPI染色
	Control	Psypac 469-487	Euba 338-355	
<i>Psychrobacter pacificus</i> NIBHP2J2	×	○	○	○
<i>P. pacificus</i> NIBHP2J3	×	○	○	○
<i>P. pacificus</i> NIBHP2J13	×	○	○	○
<i>P. pacificus</i> NIBHP2K6 (=IFO 16270)	×	○	○	○
<i>P. pacificus</i> NIBHP2K18	×	○	○	○
<i>Psychrobacter glacincola</i> ACAM 483*	×	○	○	○
<i>Psychrobacter frigidicola</i> ACAM 304	×	×	○	○
<i>Psychrobacter immobilis</i> ATCC 43116	×	×	○	○
<i>Psychrobacter urativorans</i> ATCC 15174	×	×	○	○
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i> ATCC 23333	×	×	○	○
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 12689	×	×	○	○
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> IFO 12711	×	×	○	○
<i>Bacillus marinus</i> ATCC 28841	×	×	○	○

\*: DNAデータベース上では、*P. endoglaciicola* として登録された。

【0035】

以上の結果は、in situハイブリダイゼーションにより、実際に作製プローブが*Psychrobacter pacificus*および*Psychrobacter glacincola*の菌株に特異的に結合し、他の属種の菌株とは結合しないことを示す。

【0036】

【発明の効果】

本発明のオリゴヌクレオチドプローブにより、深層海水の循環を知る上で有用な指標生物としての*Psychrobacter pacificus*を分子・細胞レベルで高感度、高精度に検出できる。深層海水の挙動解析やその影響評価のためには多数の微生物試料を扱う必要があるため、従来の培養法では洋上での煩雑な分離・培養操作お

よび陸上での分類・同定作業に多大な労力と時間が必要であったが、既存のデータベースでその種特異性が確認された塩基配列からなる本発明のDNAプローブを用いることにより、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種の検出や同定の迅速化、省力化を図ることができる。

【0037】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

<120> DNA probes for detecting novel psychrotrophic bacteria

<130> 11900266

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1526

<212> DNA

<213> *Psychrobacter pacificus*

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(1526)

<400> 1

ttgatcatg gctccagatt gaacgactgg gcggcaggct taacacatgc aagtcgagcg 60  
 gaaacgatga tagcttgcta ttaggcgtcg agcngccgga cgggtgagta atacttagga 120  
 atctacctag tagtggggga tagctcgggg aaactcgaat taataccgca tacgtctacg 180  
 ggagaaaagca ggggntcatt agaccttgcg ctattagatg agcctaagtc ggattagcta 240  
 gatggtgggg taaaggccta ccatggcgac gatctgtagc tggcttgaga ggatgatcag 300  
 ccacaccggg actgagacac ggcccggact ctacgggagg cagcagtggg gaatattgga 360  
 caatggnggg aaccctgac cagccatgcc gcgtgtgtga agaaggcctt ttggttgtaa 420  
 agcactttaa gcagtgaaga agactcttcg gttaataccc ggggacgatg acattagctg 480  
 cagaataagc accggctaac tctgtgccag cagccgcggt aatacagagg gtgcaagcgt 540  
 taatcggaat tactgggcgt aaagcgagcg taggtggctt gataagtcag atgtgaaatc 600  
 cccgggctta acctgggaac tgcacttgaa actgttaggc tagagtaggt gagagggaag 660  
 tagaatttca ggtgtagcgg tgaaatgcgt agagatctga aggaataccg atggcgaagg 720  
 cagcttcctg gcatcatact gacactgagg ctcgaaagcg tgggtagcaa acaggattag 780  
 ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg tctactagtc gttgggtccc ttgaggactt 840  
 agtgacgcag ctaacgcaat aagtagaccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact 900  
 caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaigcaacg 960  
 cgaagaacct tacctggtct tgacatacac agaactctgt agagatacga gagtgccttc 1020  
 gggaattgtg atacagggtc tgcattgctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080  
 aagtcccga acgagcgcaa ccttgtcct tagttaccag cacttcgggt gggaactcta 1140  
 aggatactgc cagtgcacaa ctggaggaag gcggggacga cgtcaagtca tcatggccct 1200  
 tacgaccagg gctacacacg tgctacaatg gtaggtacag agggcagcta cacagcgatg 1260  
 tgatgcgaat ctcaaaaagc ctatcgtagt ccagattgga gtctgcaact cgactccatg 1320  
 aagtaggaat cgctagtaat cgcggatcag aatgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt 1380  
 gtacacaccg cccgtcacac catgggagtt gattgcacca gaagtggta gcctaactta 1440  
 gtgaggcgga tcaccacggt gtggctgatg actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500  
 aggggaacct gcggctggat caccctc 1526

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

taatgtcatc gtccccggg

19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

tcctacggga ggcagcagtg

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

特平 1 1 - 1 4 5 3 4 2

<400> 4

catcgtttac ggcgtggac

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

gtccacgccg taaacgatg

19

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6

ttgcgctcgt tgcgggac

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7

gtcccgaac gagcgaa

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 8

gctgcctccc gtaggagt

18

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

gtgccagcag ccgcgg

16

【0038】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 2 は、プローブ配列Psypac469-487の塩基配列を示す。

配列番号 3 は、プライマー359fの塩基配列を示す。

配列番号 4 は、プライマー803rの塩基配列を示す。

配列番号 5 は、プライマー821fの塩基配列を示す。

配列番号 6 は、プライマー1104rの塩基配列を示す。

配列番号 7 は、プライマー1111fの塩基配列を示す。

配列番号 8 は、プローブEub338-355の塩基配列を示す。

配列番号 9 は、プローブContの塩基配列を示す。



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、深海に固有に生息する微生物種の遺伝情報の特徴に基づき、該微生物およびその近縁種を種特異的に検出する技術の提供を目的とする。

【解決手段】 配列番号 1 の塩基配列を有する 16S rDNA。配列番号 1 の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブ。配列番号 1 の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincola およびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定する方法。

【選択図】 なし

特平 11-145342

認定・付加情報

特許出願の番号	平成 11 年 特許願 第 145342 号
受付番号	59900492147
書類名	特許願
担当官	長谷川 実 1921
作成日	平成 11 年 7 月 14 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000001144

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号

【氏名又は名称】

工業技術院長

【指定代理人】

申請人

【識別番号】

220000404

【住所又は居所】

茨城県つくば市東 1-1-3

【氏名又は名称】

工業技術院生命工学工業技術研究所長

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 11900266

【提出日】 平成11年 6月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第145342号

【補正をする者】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院 生命工学工業技術研究所長 大箸信一

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 受託証

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 受託証（写し） 1

特平 11-145342

平成 11 年特許願第 145342 号



29910200174



書式 7

受 託 証

通知番号 : 11 生特文 第 737 号

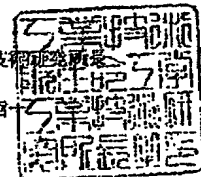
通知年月日 : 平成 11 年 5 月 21 日

工業技術院生命工学工業技術研究所長  
大 著 信 一

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所長

大 著 信 一



<b>1. 微生物の表示</b>	
(寄託者が付した識別のための表示)  P2K6	(受託番号)  FERM P- 17393
<b>2. 科学的性質及び分類学上の位置</b>	
1 種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。  <div style="text-align: center;"><input type="checkbox"/> 科学的性質  <input type="checkbox"/> 分類学上の位置</div>	
<b>3. 受領及び受託</b>	
当所は、平成 11 年 5 月 21 日に受領した 1 種の微生物を受託する。	

## 認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第145342号
受付番号	29910200174
書類名	手続補正書
担当官	長谷川 実 1921
作成日	平成11年 7月14日

### <認定情報・付加情報>

#### 【補正をする者】

##### 【識別番号】

000001144

##### 【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

##### 【氏名又は名称】

工業技術院長

#### 【指定代理人】

申請人

##### 【識別番号】

220000404

##### 【住所又は居所】

茨城県つくば市東1-1-3

##### 【氏名又は名称】

工業技術院生命工学工業技術研究所長

#### 【提出された物件の記事】

##### 【提出物件名】

受託証 (写し) 1

次頁無

特平 11-145342

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号  
氏 名 工業技術院長